Arv. Apinis
G. nr. 41.
IMI INTERNATIONAL MYCOLOGICAL INSTITUTE LIBRARY
30 MAR 1992
GUILLIERMOND, A
1936

REVUE DE MYCOLOGIE

dirigée par

ROGER HEIM

J. DUCHÉ G. MALENÇON

TOME I (N. S.) 1er Juin 1936

L'Eremothecium Ashbyii, nouveau champignon parasite des capsules du cotonnier

par A. GUILLIERMOND (Paris)

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE

DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

16, rue de Buffon, Paris (Ve)

Arv. Apinis
G. nr. 41.

L'Eremothecium Ashbyii, nouveau champignon parasite des capsules du cotonnier

par A. GUILLIERMOND (Paris)

(Pl. VII et VIII)

■

I. — Origine

Le Champignon qui fait l'objet de cette étude est un parasite isolé des capsules du Cotonnier à Berber (Soudan), par le phytopathologiste anglais R. E. Massey et qui nous a été confié par le Dr S. P. Ashby. Nous l'avons décrit sommairement dans une note antérieure sous le nom d'*Eremothecium Ashbyii.*

II. — Culture et aspect de la végétation

Ce Champignon se cultive facilement sur les milieux solides (moût de bière, gélose de Sabouraud, mélange de bouillon de pomme de terre et de carotte gélosé, tranches de carotte et de pomme de terre) et donne une végétation d'aspect gélatineux et de coloration jaune souvent très accentuée. Il végète plus difficilement en milieux liquides : sur bouillon de carotte, il ne s'accroît que très lentement ; sur moût de bière liquide, il produit d'abord une végétation très lente au fond du tube qui tend peu à peu à envahir tout le liquide, mais sans jamais parvenir

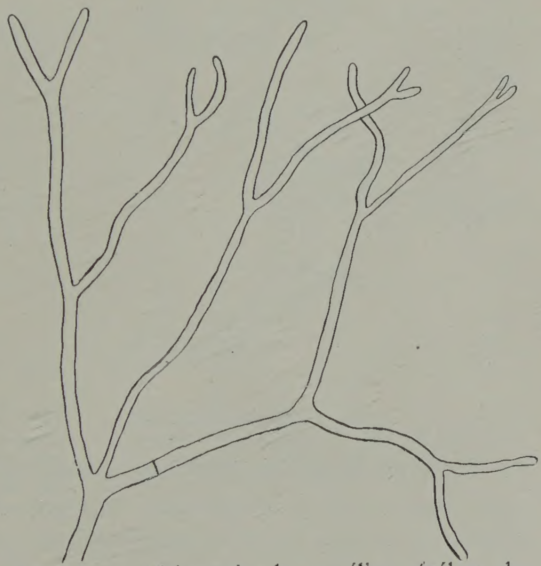


Fig. 1. — Dichotomie du mycélium (gélose de Gorodkowa, en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier).

*

à la surface et y donner un voile. Le Champignon commence à liquéfier la gélatine au bout de 8 jours et la liquéfaction devient complète après une dizaine de jours.

III. — Caractères morphologiques du Champignon

Examiné au microscope, le Champignon présente dans tous les milieux où nous l'avons cultivé des caractères sensiblement analogues. Le mycélium, dont les filaments mesurent de 2 μ 77 à 5 μ 45 de large, croît par une dichotomie assez régulière et se montre d'abord dépourvu de cloisons transversales (figure 1), présentant l'aspect du mycélium d'un Siphomycète. Les filaments de ce mycélium peuvent dans certains milieux (mélange de bouillons de pomme de terre et de carotte,

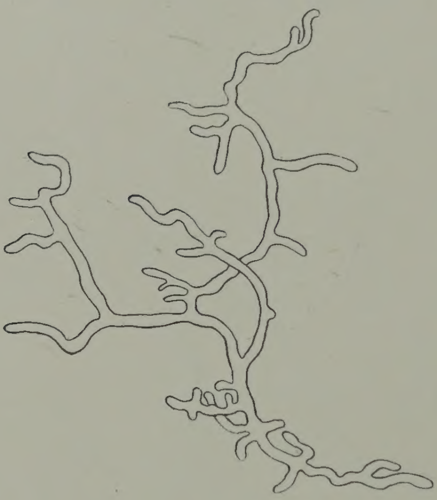


Fig. 2. — Jeune mycélium (chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, jus de carotte gélosé).

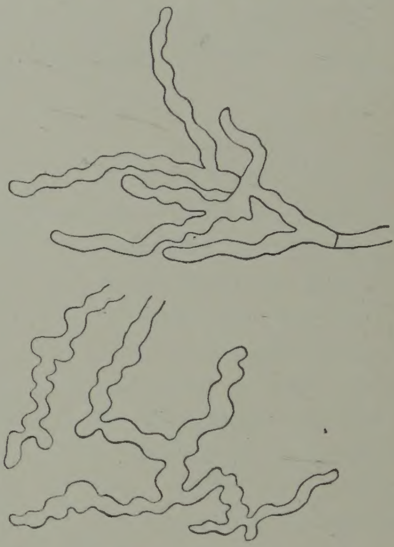


Fig. 3. — Fragments de mycélium développé sur gélose de Sabouraud en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, et dont les filaments présentent des contours sinueux et renflements.

gélose de Sabouraud glucosée), prendre des aspects particuliers que l'on observe aussi dans le *Spermophthora Gossypii* : un contour extrêmement onduleux avec même, parfois, production de renflements irréguliers, très gros (fig. 2 et 3).

Ce n'est que tardivement que l'on voit apparaître quelques cloisons

transversales : celles-ci se forment surtout à la base des rameaux, mais on voit surtout se produire de place en place des épaississements de la paroi latérale; ceux-ci, en s'accroissant, finissent par former des sortes de bouchons d'une substance réfringente qui obstruent les filaments souvent sur une longueur assez considérable. Les cloisons transversales elle-mêmes sont capables de former des épaississements irréguliers de la même substance (fig. 4). Cette substance réfringente ne se colore ni par le rouge de ruthénium, ni par l'hématoxyline de Delafield, mais prend une teinte bleue caractéristique par le bleu coton, à condition que la solution du colorant renferme un peu d'acide acétique.

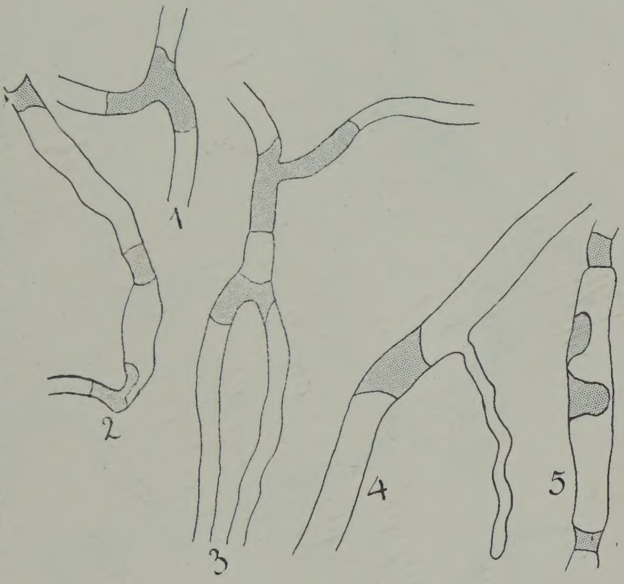


Fig. 4. — Fragments de filaments montrant des épaississements de callose de leur paroi latérale : ceux-ci en grossissant finissent par obstruer les filaments de place en place sur une longueur assez considérable en formant des bouchons de callose. Ces formations callosiques obtenues dans une culture sur moût de bière ont été colorées postvitalement par le bleu Coton qui leur donne une teinte bleu pâle.

On peut donc la considérer comme constituée par de la callose et les bouchons qui se forment ainsi sont assimilables à ceux signalés par Mangin dans le mycélium des Péronosporacées et à ceux que nous avons retrouvés dans le *Spermophtora Gossypii* et l'*Ashbya Gossypii.* Il semble, d'ailleurs, que la membrane de l'*Eremothecium* soit formée en grande partie par de la callose, car elle se colore toujours par le bleu coton additionné d'acide acétique.

Le Champignon se reproduit exclusivement au moyen de sacs spo-

Fig. 5. — Mycélium en voie de former des sporanges. Culture sur bouillon de carotte et de pomme de terre gélosé en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier.

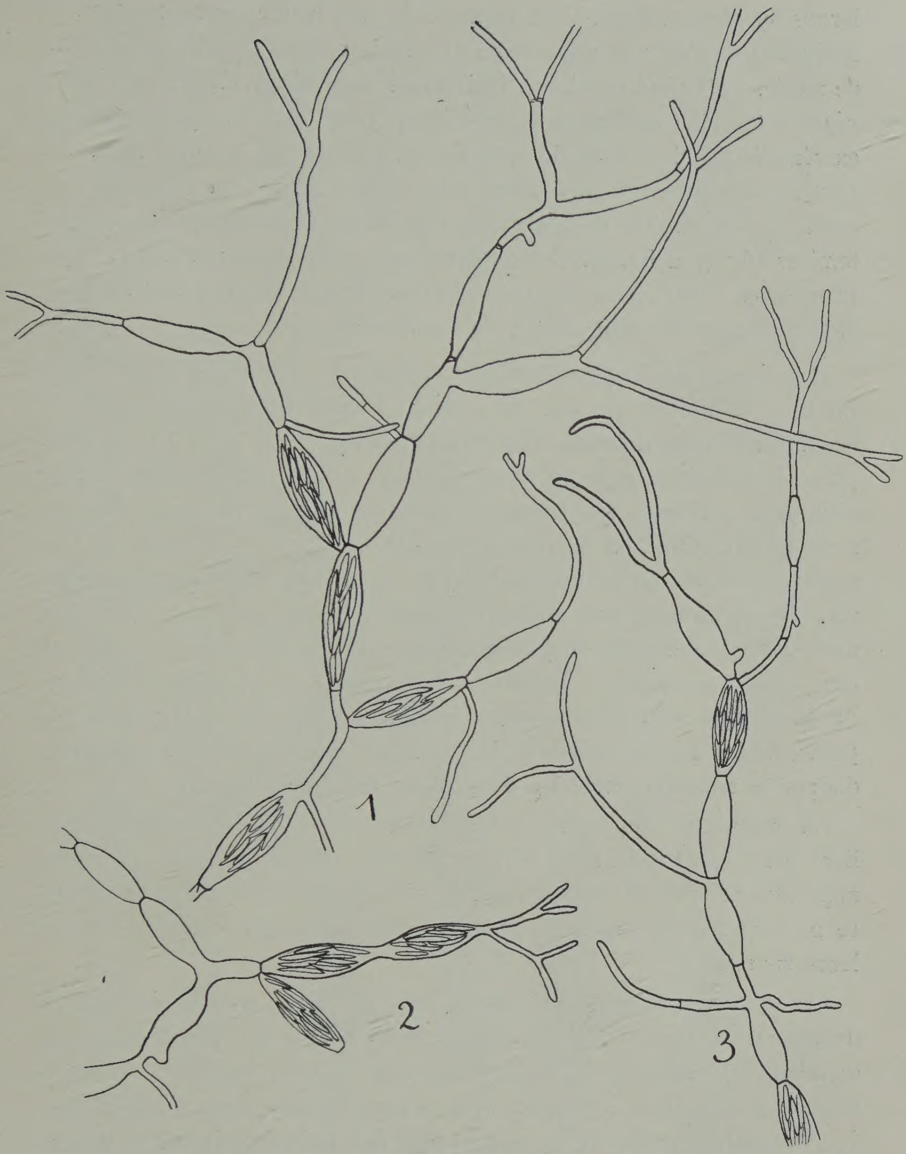


Fig. 6. — Formation des sporanges dans *Eremothecium Ashbyii* : diverses figures de mycélium avec formation des sporanges (en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier sur moût gélosé).

rifères, qui ressemblent beaucoup à des asques, mais qui, comme on le verra, ne peuvent être considérés comme tels, et que nous appel-

lerons sporanges. Ceux-ci se forment de très bonne heure, au bout de 48 heures environ : ils apparaissent en nombre considérable sous forme de renflements plus ou moins fusiformes disposés en files à partir des régions les plus anciennes du mycélium jusqu'un peu au-dessous des extrémités des filaments (fig. 5 et fig. 6). De la sorte, presque toutes les parties anciennes du mycélium sont transformées en sporanges et seules les extrémités des filaments continuent à croître et à se dichotomiser (fig. 5 et fig. 6). Ces renflements se délimitent par des cloisons transversales qui se transforment en bouchons de callose, puis ils grossissent et donnent naissance à de nombreuses spores.

Il arrive assez fréquemment que plusieurs sporanges d'une même file ne se délimitent pas par des cloisons transversales ou des bouchons de callose et restent indivis (fig. 6, n° 2, et fig. 7, n^os^ 17 et 19). D'autre part, les sporanges peuvent naître au niveau d'une ramification du mycélium et présenter les formes bifurquées (fig. 5, n° 2, et fig. 10, n^os^ 6 et 22). Enfin, on trouve parfois des sporanges très courts de formes cylindriques ou arrondies (fig. 7, n° 11). Mais d'une manière générale, les sporanges sont allongés et en forme de fuseau à extrémité assez large. Leur taille moyenne oscille entre 87 μ 5 et 68 μ 2 de long sur 14 à 16 μ de large. Toutefois, on constate de grandes différences de dimensions entre les divers sporanges et il en est qui restent très petits, tandis que les autres deviennent très grands et tous les intermédiaires se trouvent entre les dimensions extrêmes (fig. 7).

La maturation des sporanges s'effectue d'une manière assez irrégulière dans une même file et si, en général, les renflements sporifères apparaissent d'abord dans les parties les plus anciennes des filaments, ce ne sont pas toujours les premiers développés qui forment d'abord leurs spores.

Les spores apparaissent d'abord dans la région axiale, un peu en dessous des extrémités du sporange, sous forme de minces filaments onduleux et enchevêtrés les uns dans les autres, entourés de nombreuses granulations lipidiques : peu à peu, ces filaments, d'abord confus, prennent un contour de plus en plus net, puis grossissent en absorbant le cytoplasme qui n'a pas été utilisé à leur formation. Lorsque le sporange est achevé, les spores occupent tout le volume de celui-ci : elles ont la forme de longs fuseaux courbes, disposés dans les sporanges sans ordre déterminé, chevauchant les uns dans les autres et dont il est extrêmement difficile de compter le nombre d'une manière précise.

Fig. 7. — Diverses formes de sporanges sur gélose de Gorodkowa et déhiscence de ces sporanges (figures 7, 8 et 14).

Ce n'est que rarement, dans des sporanges très allongés, que les spores apparaissent disposées par groupes de 4, 5 ou 8.

Le nombre des spores paraît varier de 4 à 32 (fig. 7); peut-être même existe-t-il des sporanges renfermant plus de 32 spores. On trouve enfin exceptionnellement des sporanges ne possédant qu'une seule ou deux spores, mais ce sont des sporanges mal développés dans lesquels la formation des spores s'est probablement arrêtée (fig. 7, nos 11, 13, 15 et 16).

La numération des spores est plus facile dans les préparations fixées et colorées dans lesquelles celles-ci se dessinent avec plus de netteté; c'est donc dans ces préparations que nous nous sommes surtout attachés à compter leur nombre. Le tableau I indique le nombre des spores que nous avons trouvées dans 479 sporanges.

Tableau I : Nombre des spores comptées dans 479 sporanges

Nombre des spores	Fréquence	Pourcentage
4	11	2,34 %
6	9	1,92 %
8	55	11,75 %
10	96	20,47 %
12	141	30,06 %
14	29	6,18 %
16	74	15,75 %
18	9	1,92 %
20	15	3,19 %
24	20	4,26 %
28	9	1,92 %
32	11	2,34 %
	479	

Il est à remarquer que les spores sont d'autant plus difficiles à compter qu'elles sont plus nombreuses et qu'au delà de 16, nous ne répondons plus de l'exactitude de notre numération qui n'est qu'approximative.

Ce tableau montre que les spores sont toujours en nombre pair, ce que confirme, d'ailleurs, l'étude cytologique des sporanges immédiatement avant la formation des spores dans lesquels les noyaux se trouvent aussi en nombre pair. Il indique, en outre, que les sporanges à 8, 10, 12, 14 et 16 spores sont les plus nombreux, le nombre 12 étant prédominant (30,06 %). Les sporanges à 4 et 6 spores, de même les sporanges à plus de 16 spores, 24, 28, 32, sont au contraire rares.

Les spores une fois achevées mesurent de 29 μ à 31 μ 8 de long sur 2 μ à 2 μ 77 de large; elles ont la forme de longs fuseaux très nettement arqués : l'une de leurs extrémités est arrondie ou taillée en bi-

seau, l'autre se termine par un long prolongement courbé qui se termine par une pointe aiguë.

Les sporanges arrivés à maturité ont une paroi colorable en mauve par l'hématoxyline de Delafield et paraissant en partie mucilagineuse : ils gélifient rapidement leur paroi et les spores sont mises en liberté (fig. 7, nos 7, 8 et 14) : elles apparaissent d'abord agglomérées en petites masses, puis se dispersent dans le milieu. Bien qu'entourées d'une membrane assez épaisse elles sont très flexibles et lorsqu'un courant de la préparation les entraîne, on les voit tourner sur elles-mêmes et leur extrémité peut subir sous l'action du courant des flexions de droite à gauche, ou inversement.

Les sporanges sont, comme on l'a vu, le plus souvent disposés en files continues; cependant dans une file tous les renflements ne se transforment pas en sporanges : il en est un certain nombre qui avortent et ne produisent pas de spores. D'autre part, il peut arriver que certains articles intercalaires d'une chaîne de sporanges restent minces et ne manifestent aucune tendance à évoluer en sporanges (fig. 5 et fig. 6).

Ces sporanges avortés et les articles intercalaires stériles sont mis en liberté par la gélification des parois des sporanges formés dans le filament auxquels ils appartiennent. Aussi, dans les vieilles cultures, on ne trouve plus guère qu'un nombre considérable de spores, entremêlées à des sporanges avortés ou à de courts articles ou à des fragments de mycélium. Ces formations sont plus ou moins comparables aux arthrospores de l'*Endomyces Magnusii* et du *Geotrichum lactis* et aussi aux gemmes des Saprolégniacées (fig. 8) : ces renflements, lorsqu'on les transporte sur un milieu frais, germent en donnant sur tout leur pourtour des filaments qui se dichotomisent et reproduisent un nouveau mycélium (fig. 9); ils se composent donc comme des chlamydospores.

Parfois, après avoir donné des filaments, ils peuvent se transformer en sporanges (fig. 9, n° 8). Une fois, nous avons observé, en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, la transformation directe de l'un d'eux en sporange (fig. 10).

Dans les milieux liquides (moût de bière ou jus de carotte) le mycélium qui se développe lentement forme de nombreux sporanges, mais ceux-ci n'arrivent que rarement à complet développement et ne donnent généralement pas de spores (fig. 11).

Transportées sur milieu frais, les spores germent en reproduisant un nouveau mycélium. La germination de ces spores peut être suivie en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier. En réalité, cette germination ne se fait pas très facilement. Si l'on ensemence sur gouttelettes pendantes, avec les spores, de nombreux renflements ou articles séparés, ce sont ceux-ci qui germent le plus vite. Les spores étouffées par le développement du mycélium issu des renflements séparés ne germent pas ou forment simplement des tubes germinatifs très courts qui arrêtent leur développement.

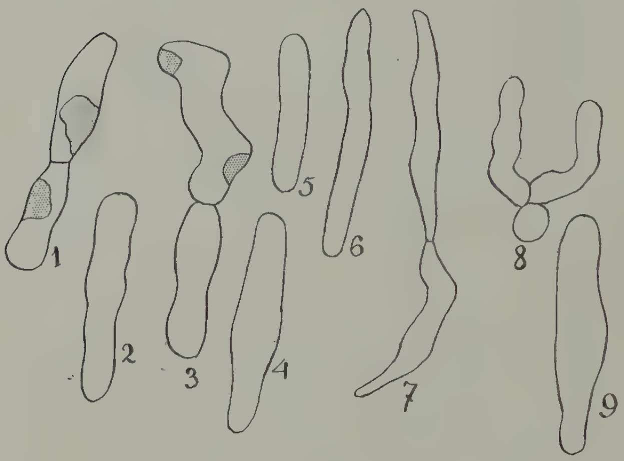


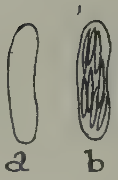
Fig. 8. — Fragments du mycélium désarticulé après déhiscence des sporanges dans une vieille culture sur gélose de Gorodkowa. Ces fragments constituent des sortes de chlamydospores capables de reproduire de nouveaux mycéliums ; beaucoup sont renflés et correspondent à des sporanges avortés ; dans les figures 1 et 3, ces articles ont formé des épaississements callosiques de leur membrane.

Pour suivre les diverses phases de leur germination, il est nécessaire de n'ensemencer, autant que possible, que des spores. Si l'ensemencement a été fait à la fin de la journée vers 19 heures, le lendemain matin les spores gonflées commencent à germer, et l'on peut suivre alors sous le microscope toutes les phases de leur germination (fig. 12, 13, 14 et 15).

La spore se gonfle dans sa partie médiane et aussi, à un moindre degré, dans son extrémité arrondie ou en biseau, tandis que son extrémité en pointe arquée conserve son volume ordinaire. Bientôt, la partie médiane la plus gonflée donne naissance à un ou plusieurs tubes germinatifs qui s'allongent et ne tardent pas à se dichotomiser et à reproduire un nouveau mycélium. Plus rarement, le tube germinatif se produit au niveau de l'extrémité arrondie de la spore.

Fig. 9. — Sporanges avortés séparés du mycélium, ensemencés sur gélose de Sabouraud glucosée en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier et en voie de germer en reproduisant de nouveaux mycéliums par formation sur leur pourtour de filaments qui se ramifient. Dans la fig. 8, le renflement, après avoir donné des rameaux, s'est transformé en sporange.

Fig. 10. — *a*. Sporange avorté placé sur gélose de Sabouraud en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier; *b*, le même au bout de 12 heures : au lieu de se développer en mycélium, ce sporange avorté a donné naissance à des spores.



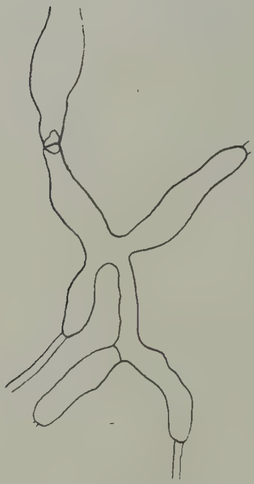


Fig. 11. — Sporanges avortés formés sur bouillon de carotte liquide, dans une culture d'un mois.

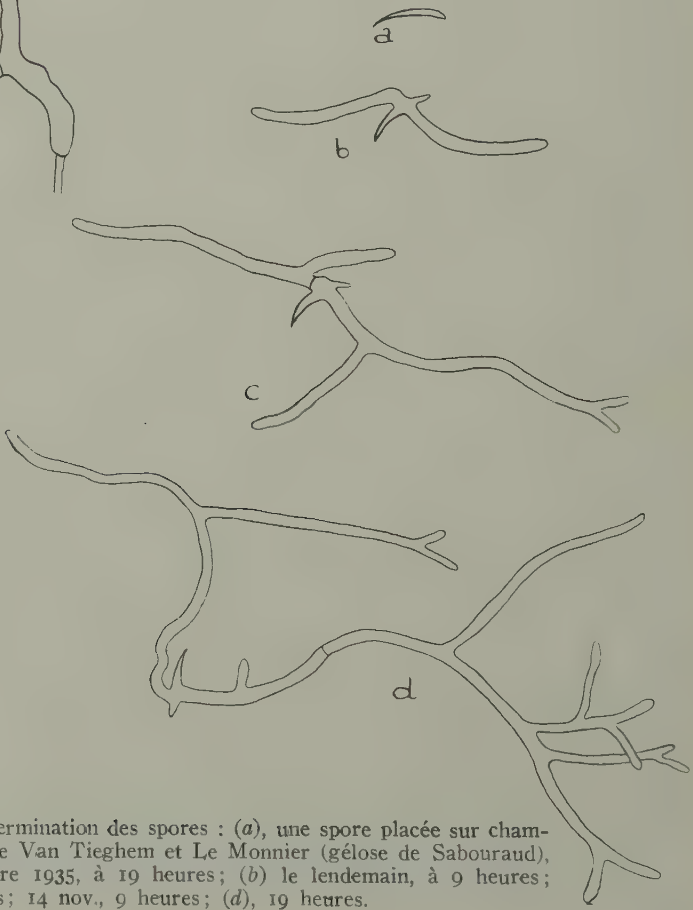


Fig. 12. — Germination des spores : (*a*), une spore placée sur chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier (gélose de Sabouraud), le 12 novembre 1935, à 19 heures; (*b*) le lendemain, à 9 heures; (*c*), 19 heures; 14 nov., 9 heures; (*d*), 19 heures.

Fig. 13. — Germination des spores.

Fig. A. — 1, une spore placée sur gouttelette pendante de gélose de Sabouraud sur chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, le 20 novembre 1935, 19 heures, et examinée le lendemain à 9 heures; 2, 10 heures; 3, 12 heures; 4, 15 heures; 5, 21 novembre, 9 heures; 6, 19 heures.

Fig. B. — 1, une spore placée dans les mêmes conditions le 16 mars 1935 et examinée le lendemain à midi; 2, 16 heures; 3, 19 heures; 4, 17 mars, 10 heures.

Fig. C. — 1, une spore placée sur gouttelette pendante de gélose de Sabouraud sur chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, le 16 mars 1934, et observée le 14 à midi; 2, 16 heures; 3, 19 heures; 4, 17 mars, 10 heures.

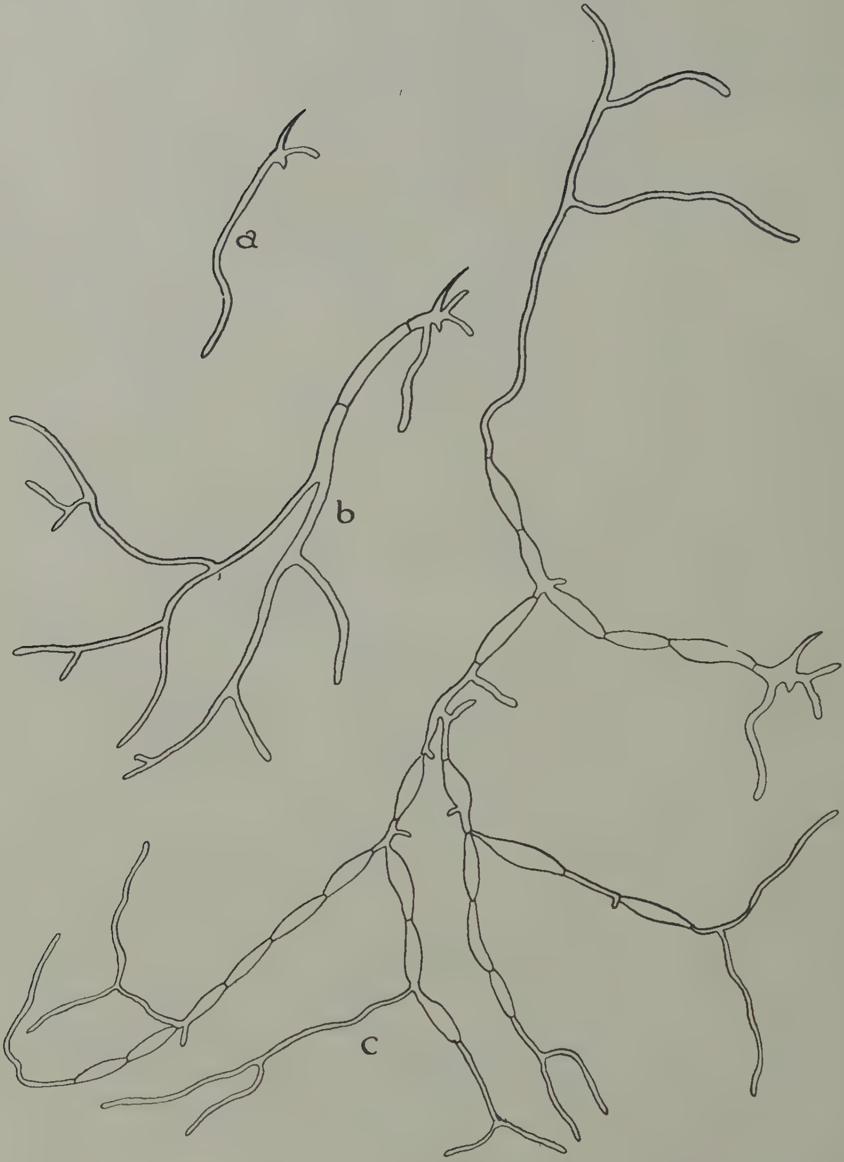


Fig. 14. — Germination des spores. — (*a*) Une spore placée sur gélose de Sabouraud en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, le 13 novembre 1935, à 19 heures, et observée le lendemain à 9 heures ; (*b*), le 14 novembre, à 9 heures ; (*c*), le 15 novembre, à 9 heures ; les sporanges commencent à se former.

Fig. 15. — Diverses formes de germination des spores sur gélose de Sabouraud glucosée en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier.

Les filaments formés par la germination de la spore restent ordinairement assez longtemps sans former de cloisons. Cependant, dans certains cas, quelques cloisons rares peuvent apparaître au niveau des rameaux ou même dans la région du filament située un peu au-dessus de la spore. Dès que le mycélium a acquis un certain développement, presque tous les filaments à partir de la spore se décomposent en renflements fusiformes qui se délimitent par des cloisons ou des bouchons de callose et se transforment en sporanges; seules les extrémités des rameaux ne subissent pas cette transformation; ils restent minces, avec peu ou pas de cloisons et continuent à s'accroître en se dichotomisant. Lorsque le mycélium issu de la germination, déjà très

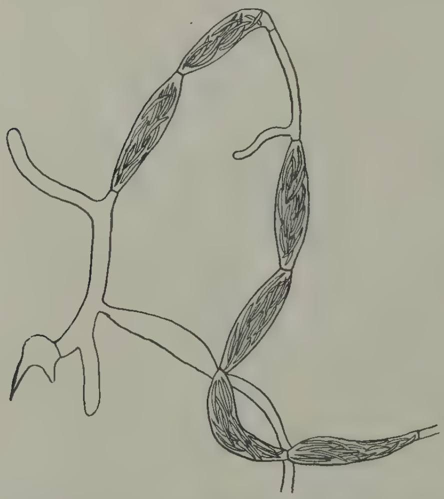


Fig. 16. — Mycélium issu de la germination d'une spore, donnant naissance dans les filaments presque immédiatement au-dessus de la spore, à de nombreux sporanges (culture sur chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, gélose de Sabouraud glucosée).

développé, commence à former des sporanges, la pointe aiguë et parfois même la pointe arrondie de la spore restent visibles (fig. 16). Les sporanges se forment plus rapidement en gouttelettes pendantes que dans les conditions ordinaires, par suite du manque d'aliment (fig. 13, 14 et fig. 15, n^{os} 29, 30 et 31). Certaines spores germant en retard donnent seulement de courts filaments qui arrêtent leur développement : quelques-unes forment simplement un gros renflement qui cesse de croître (fig. 15, n^{os} 9, 10 et 12). Enfin, beaucoup de spores demeurent sans germer.

IV. — Caractères cytologiques

Le mycélium observé sur le vivant montre de grosses vacuoles entourées de nombreuses granulations lipidiques osmioréductrices. Les noyaux et les chondriosomes ne sont pas visibles. Les colorations vitales au rouge neutre font apparaître dans ces vacuoles de nombreuses granulations fortement colorées et animées de mouvements browniens

Fig. 17. — 1 et 2, sporanges au début de la formation des spores observés vitalement ; on voit les spores encore petites rassemblées au milieu et entourées de granulations graisseuses ; 3 et 4, sporanges en formation colorés vitalement par le rouge neutre : le colorant a déterminé la précipitation de la métachromatine dans les vacuoles sous forme de granulations fortement colorées ; 5, extrémité du rameau coloré vitalement par le rouge neutre : les vacuoles sont uniformément colorées et apparaissent très petites à l'extrémité ; 6, *a*, *b* et *c* : spores colorées vitalement par le rouge neutre : on y voit les vacuoles très petites et uniformément colorées ; dans la fig. *c* on a dessiné, en outre, les granulations graisseuses ; 7, spore observée sous coloration vitale et dans laquelle on a dessiné les globules graisseux.

qui se fusionnent les unes dans les autres et finissent pas s'accoler sur le bord de la vacuole formant des croissants qui, peu à peu, se dissolvent, tandis que les vacuoles se colorent uniformément (fig. 17, n° 5). Ces vacuoles, très petites aux extrémités des filaments, se gonflent rapidement et se fusionnent les unes aux autres pour constituer de

grosses vacuoles. Avec le bleu de crésyl et le bleu de Nil, les granulations des vacuoles apparaissent teintes en rouge violet; nous verrons plus loin que ces granulations présentent les caractères de la métachromatine.

Les granulations lipidiques apparaissent dans les filaments les plus jeunes et deviennent de plus en plus nombreuses et de plus en plus grosses à mesure que les filaments vieillissent. Elles sont presque toujours localisées autour des vacuoles.

Le cytoplasme renferme, en outre, une grande abondance de glycogène que l'on peut facilement mettre en évidence par le réactif iodo-ioduré : ce produit apparaît d'abord sous forme d'îlots ou de plages dans le cytoplasme, en particulier autour des vacuoles, mais il peut également diffuser dans les vacuoles.

Les renflements destinés à se transformer en sporanges présentent d'abord plusieurs grosses vacuoles de tailles différentes, disposées en files et entourées de nombreuses granulations lipidiques. Les vacuoles (fig. 17, 3 et 4) se montrent plus riches en métachromatine que dans les autres parties des filaments. Le glycogène est également plus abondant et très fréquemment diffusé dans les vacuoles qui, avec le réactif iodo-ioduré, prennent une teinte brun acajou diffuse ou montrent de gros globules présentant les caractères du glycogène.

Dans une phase ultérieure, les vacuoles deviennent plus petites et plus nombreuses, et le cytoplasme prend un aspect alvéolaire, puis on voit se différencier dans la région axiale, un peu au-dessous des extrémités des sporanges, un cytoplasme dense (cytoplasme sporogène), rempli de granulations graisseuses, tandis que le reste de la cellule (épiplasme) est occupé par un cytoplasme très riche en glycogène, rempli de petites vacuoles contenant de la métachromatine en grande abondance. C'est dans le cytoplasme sporogène que se dessinent bientôt les spores sous forme de minces filaments confus et enchevêtrés, entourés de granulations graisseuses. Les filaments grossissent peu à peu et deviennent des spores fusiformes (fig. 17, 1 et 2) : celles-ci finissent par occuper tout le sporange après avoir absorbé l'épiplasme.

Les spores renferment plusieurs globules lipidiques échelonnés sur leur longueur et de petites vacuoles également au nombre de plusieurs que le rouge neutre colore uniformément en rouge (fig. 17, n° 6). Au début de leur formation, elles peuvent contenir quelques petits îlots

Fig. 18. — *Eremothecium Ashbyii* (fixation au picroformol de Bouin, coloration à l'hématoxyline ferrique).

Fig. 1, 2 et 3 : extrémités de mycélium.

Fig. 4 à 15 : début de la formation des sporanges aux dépens d'articles possédant dès leur origine plusieurs noyaux, de 2 à 5; exceptionnellement certains sporanges peuvent se former aux dépens d'une cellule uninucléée (fig. 7).

de glycogène, mais, une fois mûres, elles sont totalement dépourvues de ce produit.

Après fixation par le mélange de Bouin et coloration par l'hématoxyline ferrique, les noyaux apparaissent sous forme de vésicules à paroi colorée et renferment un nucléoplasme incolore dans lequel se trouve un gros nucléole et un réseau chromatique plus ou moins distinct. Ces noyaux sont distribués à intervalles assez réguliers dans les filaments jeunes encore dépourvus de cloisons, puis lorsque les filaments se sont cloisonnés ou divisés en segments par des bouchons de callose, les articles ainsi délimités sont presque toujours plurinucléés : on en rencontre cependant çà et là qui ne possèdent qu'un seul noyau (fig. 18, n^os^ 1 à 3).

Les colorations à l'hématoxyline de Delafield, après fixation au liquide de Bouin, font apparaître dans les vacuoles des granulations teintes en rouge correspondant à celles que mettaient en évidence les colorations vitales et qui présentent tous les caractères des corpuscules métachromatiques (Pl. VII, fig. 19).

Les jeunes sporanges apparaissent sur le trajet des filaments comme de petits renflements à cytoplasme contenant de grosses vacuoles et délimités par des bouchons de callose qui ne prennent pas les colorants (fig. 18, 7 à 15); dans les préparations colorées à l'hématoxyline de Delafield, les vacuoles apparaissent remplies de corpuscules métachromatiques (Pl. VII, fig. 18). On trouve exceptionnellement de jeunes sporanges qui ne renferment qu'un seul noyau (fig. 18, n° 7), mais presque tous sont pourvus dès le début de plusieurs noyaux (fig. 18, n^os^ 4 à 15) : ceux-ci sont le plus souvent au nombre de 2 à 4, mais il peut en exister plus, de 5 à 9. L'examen d'un très grand nombre de sporanges encore très petits et venant de se délimiter montre que, bien que des sporanges uninucléés puissent exister, les jeunes sporanges renfermant plusieurs noyaux ne dérivent pas de sporanges primitivement uninucléés. Outre que les jeunes sporanges uninucléés sont très rares (on en compte environ 1,14 %), les jeunes sporanges renferment très fréquemment un nombre impair de noyaux : 3, 5, 7, 9, et les mitoses des sporanges se produisant toujours simultanément pour tous les noyaux d'un même sporange, comme nous le verrons plus loin, aboutissent à la formation de sporanges à 6, 12, 10, 20, 14, 18 spores, ce qui apporte la preuve incontestable que les sporanges renfermèrent à leur origine plusieurs noyaux.

Lorsque le sporange a acquis une certaine dimension, les noyaux

entrent en mitose, et ce phénomène porte toujours simultanément sur tous les noyaux. Cette mitose est très difficile à suivre dans le détail, étant donné la petitesse des noyaux, mais donne cependant des figures suffisamment nettes pour que l'on puisse affirmer qu'elle s'effectue selon les mêmes processus que ceux qui ont été décrits dans l'asque des Ascomycètes supérieurs. Elle se manifeste d'abord par des stades de prophase dans lesquels le réseau chromatique, très distinct dans les phases antérieures, se trouve remplacé par des grains de chromatine (pl. VII, fig. 4) petits, mais bien apparents. Viennent ensuite des stades de métaphase caractérisés par un léger allongement du noyau qui conserve sa paroi et au milieu duquel apparaît un fuseau achromatique, contenant, groupés à l'équateur, de petits chromosomes punctiformes (planche VII, figures 5 à 11). Ceux-ci sont trop petits pour qu'il soit possible de les compter; ils donnent cependant l'impression d'être au nombre de 8 environ. En même temps, le nucléole se rapetisse et semble se résorber. Il paraît exister un centrosome aux deux extrémités du fuseau achromatique. D'autres stades suivent dans lesquels les chromosomes devenus très petits et plus nombreux semblent occuper toute la longueur du fuseau (pl. VII, fig. 9). Les stades ultérieurs ne peuvent être suivis d'une manière précise; on trouve cependant quelques stades de télophase où la membrane nucléaire s'étant résorbée, les noyaux fils disposés par paires et réduits à de petites agglomérations de chromatine sont parfois reliés l'un à l'autre par un mince filament, reste du fuseau.

Lorsque ces mitoses ont pris fin, les noyaux sont répartis dans les nœuds de la trame cytoplasmique limitant les mailles des nombreuses vacuoles qui occupent tout le sporange. Leur nombre oscille entre 8 et 20 au plus (pl. VII, fig. 12). On voit ensuite se différencier dans l'axe du sporange, un peu au-dessous de ses deux pôles, un cytoplasme très chromophile (cytoplasme sporogène) au milieu duquel se placent les noyaux qui dès ce moment cessent d'être visibles; le reste peu chromophile et très vacuolaire constitue l'épiplasme (pl. VII, fig. 13 à 15. Le cytoplasme sporogène se découpe bientôt en filaments allongés, onduleux, enchevêtrés les uns dans les autres et doués d'une forte chromaticité, qui correspondent aux jeunes spores. Celles-ci s'épaississent, prennent un contour plus distinct et s'entourent d'une membrane. Elles prennent alors l'aspect de fuseaux allongés et courbes, renfermant un noyau placé au centre, et sont entourés de granulations sidérophiles qui paraissent correspondre à des corpuscules

métachromatiques, car les colorations à l'hématoxyline de Delafield et les colorations vitales révèlent la présence d'une accumulation de métachromatine autour des spores. Ces spores en grossissant et après avoir absorbé l'épiplasme arrivent à occuper tout le volume du sporange (pl. VII, fig. 20 et 21).

Nous avons essayé d'obtenir de meilleures figures des mitoses par l'emploi de fixations au liquide de Flemming, mais celles-ci n'ont pas donné des images sensiblement plus nettes que les fixations au liquide de Bouin.

Il est très difficile de déterminer quel est le nombre des mitoses que subissent les noyaux dans les sporanges et de savoir si ce nombre est régulier. Nous avons vu qu'exceptionnellement quelques sporanges peuvent ne posséder au début qu'un seul noyau, mais que presque tous en renferment plusieurs. Nous avons compté le nombre des noyaux dans de jeunes sporanges, et nous indiquons dans le tableau suivant les résultats de cette numération qui porte sur 615 sporanges :

Tableau II : Nombre des noyaux dans les sporanges

Nombre	Fréquence	Pourcentage
1	12	1,95 %
2	264	42,92 %
3	313	50,86 %
4	130	20,11 %
5	81	13,17 %
6	79	12,84 %
7	55	8,94 %
8	45	7,31 %
9	16	2,60 %
	615	

Les mitoses s'opérant, comme nous l'avons vu, toujours simultanément pour tous les noyaux d'un même sporange, il est donc certain que les sporanges à 3, 5, 7, et 9 noyaux correspondent à de jeunes sporanges n'ayant pas encore divisé leurs noyaux ; quant aux sporanges contenant 6 et 8 noyaux, il est probable que, parmi eux, il en est un certain nombre qui résultent de sporanges ne contenant primitivement que 3 ou 4 noyaux et qui ont déjà subi une mitose.

Étant donné que nous savons que les mitoses se produisent toujours simultanément dans les sporanges, il est possible, en comparant les proportions des noyaux contenus dans les jeunes sporanges et exprimées en % et les proportions en % des spores contenues dans les

sporanges, de nous faire une idée approximative du nombre des mitoses que doivent subir les noyaux des sporanges avant la formation des spores. On peut supposer, en effet, que chaque noyau ne subit qu'une seule mitose ou bien deux ou trois mitoses successives. Dans le tableau suivant (Tableau III), nous avons placé dans la première colonne les nombres en % des noyaux contenus dans les jeunes sporanges, d'après nos numérations indiquées dans le tableau II, et dans les autres colonnes les nombres de spores que l'on devrait obtenir en supposant que les noyaux subissent une seule mitose, deux mitoses ou trois mitoses et les nombres en % des spores obtenues dans nos numérations indiquées dans le tableau I.

TABLEAU III

Pourcentage du nombre des noyaux dans les jeunes sporanges.		Nombre des spores que l'on devrait obtenir en supposant que chaque noyau subit une seule mitose et pourcentage du nombre de spores.		*Idem*, en supposant l'existence de 2 mitoses successives.		*Idem*, en supposant l'existence de 3 mitoses successives.	
1......	1,95 %	2........	0 %	4......	2,34 %	8......	11,75 %
2......	42,92 %	4........	2,34 %	8......	1,92 %	16......	15,75 %
3......	50,86 %	6........	1,92 %	12......	30,06 %	24......	4,26 %
4......	20,11 %	8........	11,75 %	16......	15,75 %	32......	2,34 %
5......	13,17 %	10........	30,06 %	20......	3,19 %	40......	0 %
6......	12,84 %	12........	30,06 %	24......	4,26 %	48......	0 %
7......	8,94 %	14........	6,18 %	28......	1,92 %	56......	0 %
8......	7,31 %	16........	15,75 %	32......	2,34 %	64......	0 %
9......	2,60 %	18........	1,92 %	36......	0 %	72......	0 %

Ce tableau montre qu'il est impossible d'admettre que les noyaux ne subissent qu'une seule mitose, du moins dans un grand nombre de cas. Il n'y a, en effet, aucune relation entre le nombre des noyaux des jeunes sporanges et le nombre des spores que l'on devrait obtenir si les noyaux ne se divisaient qu'une seule fois. C'est ainsi, par exemple, que nous trouvons 42,92 % des jeunes sporanges qui renferment 2 noyaux, alors que la proportion des sporanges à 4 spores n'est que de 2,34 %. De même, il y a 50,86 % des jeunes sporanges à 3 noyaux, et l'on ne constate que 1,92 % de sporanges renfermant 6 spores. D'ailleurs l'hypothèse d'une seule mitose ne permettrait pas d'expliquer l'existence cependant très fréquente de sporanges à 20, 24, 28 et 32 noyaux.

Les chiffres consignés dans le tableau III sont beaucoup plus favorables à l'hypothèse consistant à admettre que les noyaux subissent

deux mitoses successives. C'est ainsi qu'il semble exister une certaine relation entre la proportion des jeunes sporanges à 3 noyaux (50,86 %) et celle des sporanges à 12 spores (30,60 %); il en est de même entre la proportion des jeunes sporanges à 4 noyaux (20,11 %) et celle des sporanges à 16 spores (15,75 %), etc. Toutefois, il est impossible d'admettre l'existence régulière de deux mitoses successives dans tous les sporanges, étant donné que nous trouvons des sporanges renfermant 4, 12, 10, 14 et 18 spores.

Quant à l'hypothèse de 3 mitoses successives s'effectuant régulièrement, elle ne peut être admise, car elle exigerait l'existence de sporanges contenant 40, 48, 56, 64 spores, etc., qui n'a pu être constatée.

Le tableau III nous amène donc à conclure que le nombre des mitoses ne semble pas régulier et que, dans certains sporanges, les noyaux peuvent ne se diviser qu'une seule fois, tandis que dans les autres, ils paraissent subir deux mitoses et peut-être même trois.

Ainsi, comme on le voit, la formation des sporanges dans notre *Eremothecium* s'effectue dans l'ensemble par des processus cytologiques tout à fait analogues à ceux que l'on constate pour la formation des asques : toutefois, il existe entre l'asque des Ascomycètes et le sporange de l'*Eremothecium* une différence essentielle, c'est que le premier dérive d'une cellule uninucléée, alors que le second prend naissance presque toujours aux dépens d'un article pourvu de plusieurs noyaux. En outre, l'asque est toujours le siège d'au moins deux mitoses successives, au cours desquelles s'opère la réduction chromatique, alors que, dans le sporange de notre Champignon, le nombre des mitoses n'est pas régulier, les noyaux pouvant se diviser selon les cas une seule fois ou deux fois.

Les spores montrent un noyau placé au milieu et plusieurs petites vacuoles renfermant un seul corpuscule métachromatique (pl. VII, fig. 16 et 17). L'extrémité pointue est dépourvue de contenu et offre une ligne saillante de sa paroi suivant l'axe longitudinal de la pointe, mais très peu accentuée. La membrane présente, en outre, des épaississements latéraux : ceux-ci apparaissent très nettement après coloration par l'hématoxyline de Delafield qui leur donne une teinte mauve : ils se colorent aussi par l'hématoxyline ferrique, le rouge de ruthénium et par le rouge neutre. Ils paraissent donc constitués par une substance pectique (fig. 19).

Nous avons négligé dans cette étude les chondriosomes qui n'offraient qu'un intérêt secondaire dans le but que nous poursuivions et

Fig. 19. — *Eremothecium Ashbyii.* Spores colorées post-vitalement par l'hématoxyline de Delafield et dessinées à un très fort grossissement : on aperçoit des épaississements latéraux de la paroi colorés en mauve et sans doute de nature mucilagineuse. Dans les fig. 17 et 18 on a dessiné les granulations graisseuses. En outre, dans les fig. 16 et 18, on aperçoit une ligne saillante dans l'axe de la pointe saillante de la spore. La fig. 19 représente une spore au début de sa germination, qui montre la même ligne saillante.

sur lesquels nous nous réservons de revenir. Nous nous bornerons pour le moment à dire que l'on peut obtenir ceux-ci après fixation par liquide de Meves : ils affectent en général la forme de chondriocontes.

V. — Le pigment jaune

Le Champignon offre un pigment jaune citron. Celui-ci n'apparaît que lorsque la croissance commence à se ralentir et que la tempéra-

ture se trouve au voisinage de 25°. Il se forme surtout en abondance sur géloses de Gorodkowa et de Sabouraud, où le mycélium apparaît avec une teinte jaune très prononcée. Il apparaît en grande abondance aussi sur jus de carotte. Dans les milieux gélosés, il diffuse dans le substratum auquel il confère une couleur jaune ; en culture sur pomme de terre ou carotte, il diffuse dans l'eau contenue dans le renflement du tube de Roux.

A l'examen microscopique, le pigment n'apparaît que dans les filaments qui ont arrêté leur croissance et dans lesquels il n'y a pas ou

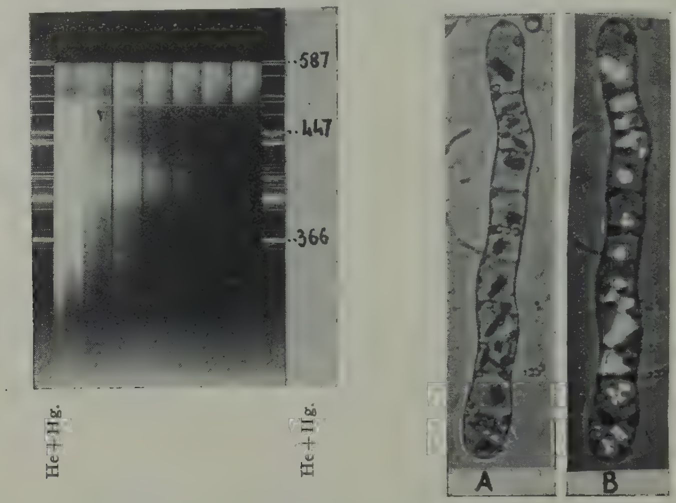


Fig. 20. — 1, spectrogramme d'absorption de la solution aqueuse du pigment jaune d'*E. Ashbyii;* 2, portions de filaments du Champignon montrant des cristaux du pigment dans les vacuoles (B en lumière polarisée).

presque pas de glycogène : il est surtout abondant dans les renflements détachés du mycélium qui n'ont pas abouti à former de spores ou dans les articles minces situés entre des files de sporanges. Il est exclusivement localisé dans les vacuoles, où il se trouve dissous dans le suc vacuolaire, mais très fréquemment il s'y cristallise sous forme de nombreuses aiguilles, parfois très longues et disposées sans ordre ou groupées en faisceaux ou entrecroisées ou disposées autour d'un axe. Ces aiguilles, généralement très minces, peuvent parfois être assez épaisses (planche VIII). Le pigment peut se cristalliser également, mais moins fréquemment, sous forme de sphérocristaux parfois très

gros, de 4 à 5 μ de diamètre. Ces cristaux observés entre nicols croisés offrent une très forte biréfringence, et le phénomène de la croix noire quand ils sont à l'état de sphérocristaux (figure 20, n° 2). A côté de ces cristaux de pigment, on rencontre parfois quelques cristaux incolores dans les vacuoles dépourvues de pigment et qui correspondent peut-être au leucodérivé du pigment.

Le pigment ne présente pas les réactions microchimiques des composés phénoliques : le perchlorure de fer, l'acide chromique, le bichromate de potassium, l'acide osmique ne donnent aucune réaction. Il n'est donc pas un dérivé de l'anthaquinone comme il en existe dans certains Champignons. Les vacuoles qui le renferment prennent avec le bleu de crésyl une teinte verte qui tranche avec la coloration violette que prennent les vacuoles qui en sont dépourvues : généralement elles ne renferment pas de corpuscules métachromatiques ou seulement très peu, et ceux-ci, quand ils existent, continuent à se colorer en violet-rouge. Ce virage au vert n'est pas l'indice d'une acidité du suc vacuolaire, car avec le rouge neutre on obtient le résultat inverse : les vacuoles qui contiennent le pigment se teintent en rouge-orangé, tandis que les vacuoles qui n'en ont pas prennent une teinte rouge cerise. La teinte verte que prennent les vacuoles à pigment par le bleu de crésyl et la teinte orangée qu'elles prennent par le rouge neutre résultent simplement d'une superposition du pigment et du colorant. Les alcalis (potasse, soude) et les acides (HCl et $SO^4 H^2$) font disparaître assez rapidement le pigment. Par le réactif iodo-ioduré, les filaments renfermant le pigment se colorent en jaune et tranchent avec les autres qui prennent une teinte brun acajou qui s'explique par le fait qu'ils ne contiennent pas de glycogène, puis bientôt les cristaux, quand ils existent, prennent une teinte verte très accentuée qui disparaît ensuite par dissolution de ceux-ci. Dans les vacuoles dans lesquelles le pigment est dissous dans le suc vacuolaire, le réactif iodo-ioduré précipite le pigment en vert et le plus souvent détermine la formation de nombreux sphérocristaux verts présentant en lumière polarisée, avec une grande netteté, le phénomène de la croix noire. Ces cristaux se dissolvent ensuite et la coloration verte disparaît. Le pigment est facilement soluble dans l'eau et l'alcool, et ses extraits ne présentent aucune des réactions des composés phénoliques.

Le pigment a été étudié avec la collaboration de M. Fontaine et de Mlle Raffy. Il présente une belle fluorescence verte sous l'influence des rayons ultra-violets : celle-ci se manifeste, soit dans la culture,

soit dans la solution aqueuse du pigment, soit sous le microscope dans le pigment à l'état de solution dans la vacuole. Cette fluorescence est analogue à celle que donnent les flavines découvertes dans la Levure de bière par Warburg, retrouvées ensuite par de nombreux auteurs dans les tissus animaux et végétaux les plus divers et assimilées par Kuhn, Szent-Györgyi et Wagner-Jauregg à la vitamine B^2. Comme les flavines, il est très soluble dans l'eau, un peu moins dans l'alcool, insoluble dans l'éther et le chloroforme et précipite partiellement par l'acétate de plomb. Sa fluorescence est conservée intégralement quand on ajoute à la solution du formol ou de l'iode.

Si l'on ajoute à la solution aqueuse du pigment contenu dans un tube à essais une trace d'hydrosulfite de soude, on constate la décoloration de la solution et la disparition de la fluorescence. En agitant le tube à l'air, la teinte jaune et la fluorescence réapparaissent. Ce phénomène caractéristique des flavines n'a cependant pas été observé nettement dans les filaments eux-mêmes sous le microscope.

Une solution alcaline du pigment de pH=8,8 présente une belle fluorescence verte. L'addition goutte à goutte, dans cette solution, de la liqueur normale de soude provoque la diminution, puis la disparition de la fluorescence verte qui fait place à une fluorescence bleue. L'addition goutte à goutte de la solution normale de HCl fait réapparaître la fluorescence verte. Une solution acide de pH=3 offre une fluorescence verte typique. Si l'on ajoute goutte à goutte de la solution normale de HCl, la fluorescence pâlit, puis disparaît, remplacée par une fluorescence bleue. L'addition de la liqueur normale de soude ramène la fluorescence verte. On sait que pour les flavines, la fluorescence est constatée entre pH=3 et pH=9 ; au-dessus et au-dessous de ces pH, la fluorescence diminue beaucoup, puis passe au bleu, et ces virages sont réversibles.

En irradiant par les rayons ultra-violets, pendant 1 h. 30 environ, une solution aqueuse alcaline de pigment, puis, en agitant la solution avec du chloroforme après acidification, le chloroforme se colore en jaune et présente une belle fluorescence verte. Après la même opération répétée avec une solution non irradiée, on constate que le chloroforme ne dissout pas le pigment. Rappelons que c'est là une propriété très spécifique des flavines : si l'on soumet à l'irradiation ultra-violette une solution alcaline de flavine, on peut, après acidification, extraire avec le chloroforme un pigment, la lumiflavine, tout à fait analogue par sa couleur et sa fluorescence à la flavine primitive, mais qui, en

milieu acide, est soluble dans le chloroforme, contrairement à la flavine. Enfin, comme les flavines, le pigment en solution acide minéral normale, peut être facilement adsorbé par la terre d'infusoires et extrait de cet adsorbant par le mélange pyridine-méthanol-eau, utilisé dans la purification des flavines.

Avec un spectrographe permettant d'étudier seulement le visible et le très proche ultra-violet (jusqu'à 3.600 A, environ), le pigment se comporte encore comme une flavine : on observe avec la solution aqueuse du pigment une bande dans le visible d'axe variant de λ 444 à 447 suivant les spectrogrammes et une autre bande dans l'ultra-violet débutant vers λ 390 (fig. 20, n° 1). Les flavines présentent, on le sait, une bande dans le visible d'axe d'environ 445, et une bande dans le proche ultra-violet d'axe λ 370, qui commence précisément vers λ 390.

Tous ces caractères permettent donc d'identifier le pigment du Champignon au groupe des flavines qui comprend les flavoprotéines et flavines types, et de le rapporter à ces dernières, étant donné qu'il est parfaitement dialysable en sac de collodion.

Nous avons d'ailleurs comparé le pigment du Champignon avec la lactoflavine extraite à l'état de pureté, dont le Professeur Karrer a eu l'obligeance de nous envoyer un échantillon. Nous avons pu constater que les caractères de ces deux pigments sont bien les mêmes. Toutefois, nous n'avons pu retrouver sur la lactoflavine la formation de cristaux verts, par l'iode, constatée dans les vacuoles du Champignon.

Etant donné que l'on sait que les flavines constituent un ferment typique d'oxydo-réduction qui se combine à l'hydrogène d'une manière réversible et que Warburg a nommé « le bleu de méthylène de la cellule », il est très probable que ce pigment joue un rôle important dans le métabolisme de ce Champignon comme accepteur d'hydrogène. En tout cas, il est très curieux de constater l'accumulation considérable de pigment dans le Champignon que nous venons d'étudier. Il n'a pas été signalé, jusqu'ici, à notre connaissance, de cas où il y ait une semblable production de flavines.

V. — Affinités du champignon.

Il est incontestable que le Champignon que nous avons décrit ici présente une très étroite relation avec l'*Ashbya Gossypii* (Ashby et Nowel), dont nous avons fait l'étude cytologique dans un travail antérieur.

Notre Champignon et l'*Ashbya Gossypii* présentent exactement le même cycle de développement. Ces deux Champignons ont un mycélium peu cloisonné; cependant, dans l'*Ashbya,* les cloisons sont plus nombreuses que dans l'*Eremothecium* décrit ici. Ce mycélium se ramifie dans l'*Eremothecium* par une dichotomie assez régulière, tandis que dans l'*Ashbya,* la dichotomie est très irrégulière et le mycélium se diverticulise surtout par des rameaux latéraux. Dans les deux Champignons, au bout de trois jours environ, les filaments du mycélium produisent, au-dessous des extrémités des filaments en voie de croissance, des renflements plurinucléés disposés en chaînes, qui se transforment en sporanges renfermant de 8 à 32 spores aciculaires (1) qui sont mises en liberté par gélification des parois du sporange (fig. 21). Ces spores germent de la même manière dans les deux Champignons (fig. 22).

Dans ces deux Champignons, les articles du mycélium qui ne sont pas transformés en sporanges et les renflements sporogènes n'ayant pas évolué en sporanges, se séparent après la formation des sporanges et constituent des sortes de chlamydospores susceptibles de reproduire de nouveaux mycélium quand on les place dans des conditions favorables.

Enfin, ces deux Champignons forment un pigment jaune. Dans l'*Ashbya Gossypii,* ce pigment, moins abondant, avait passé inaperçu à Ashby et Nowell et à nous-mêmes. C'est Mme Stelling-Dekker qui a montré, pour la première fois, que dans les vieilles cultures sur moût de bière, l'*Ashbya Gossypii* prend une coloration jaune. Nous avons pu récemment confirmer l'existence de cette coloration qui se produit aussi sur gélose de Sabouraud glucosée et sur tranches de carotte à 25°. Ce pigment, par contre, ne se forme jamais sur gélose de Gorodkowa, contrairement à ce qui se passe pour l'*Eremothecium Ashbyii.* Mais ce pigment apparaît en bien moindre quantité que dans notre *Eremo-*

---

(1) Il est à remarquer que, dans l'*A. Gossypii,* les nombres de spores les plus fréquents sont aussi 12 et 16. Voici d'ailleurs le résultat de la numération de ces spores effectuée par Ashby et Nowel :

Nombre de spores	Fréquence
8	3
12	8
16	2
20	2
24	1
32	1

thecium et seulement dans les vieilles cultures. Sa production est d'ailleurs très irrégulière et dépend des conditions que nous n'avons pu préciser. L'examen microscopique du mycélium nous a montré que le pigment jaune de l'*Ashbya Gossypii* existe, comme dans l'*Ere-*

Fig. 21. — *Ashbya Gossypii*. Sporanges disposés en file : quelques-uns sont placés dans une ramification du filament et sont bifurqués. (Sur gélose de Sabouraud, en culture sur chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier.)

mothecium Ashbyii, à l'état de solution dans les vacuoles où il peut cristalliser sous les mêmes formes de cristaux en aiguilles isolées ou groupées ou de sphérocristaux. Nous avons étudié ce pigment en collaboration avec M. Fontaine et Mlle Raffy, et nos recherches nous

ont permis de l'identifier à une flavine semblable à celle de l'*Eremothecium Ashbyii.*

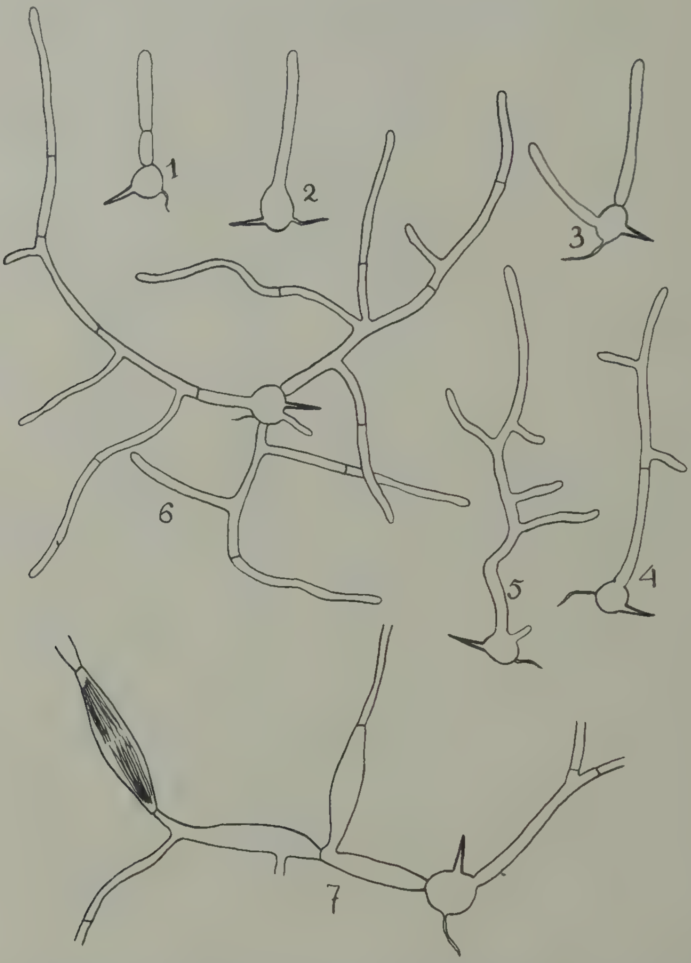


Fig. 22. — *Ashbya Gossypii;* 1 à 6, divers stades de la germination des spores observés sur gélose de Sabouraud glucosée en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier; 7, début de la formation des sporanges dans un mycélium dérivé de la germination d'une spore : on voit que les sporanges peuvent se former aux dépens des régions des filaments situés à côté de la spore.

L'*Eremothecium Ashbyii* se distingue surtout de l'*Ashbya Gossypii* par la forme et la disposition de ses spores. Les spores d'*A. Gossypii* sont rectilignes, minces, aciculaires, avec une moitié occupée par une

pointe allongée rectiligne, vide de contenu, et une autre moitié renflée, dans laquelle se trouvent le cytoplasme et le noyau, et qui se termine par un long appendice filiforme (fig. 23). Elles sont régulièrement disposées en faisceaux dans le sporange, en deux ou plusieurs groupes de quatre, placés les uns à la suite des autres. Au contraire, les spores

Fig. 23. — A. Spores de *Spermophtora Gossypii.* — B. Spores d'*Eremothecium Ashbyii.* — C. spores *d'Ashbya Gossypii.*

du Champignon que nous venons de décrire affectent, comme nous l'avons dit, la forme de fuseaux moins longs et plus larges : elles ont une extrémité se terminant en pointe aiguë fortement arquée, vide de contenu, et une autre extrémité arrondie ou taillée en biseau. Elles ont, en outre, dans leur extrémité pointue une saillie très légère de leur membrane disposée en ligne droite, difficile à apercevoir, et possèdent dans leur région moyenne des épaississements latéraux de leur paroi. Celle-ci se colore par le rouge de ruthénium, l'hematoxyline de Delafield, l'hématoxyline ferrique et le rouge neutre, surtout dans les régions épaissies, et semble constituée par des composés pectiques. On ne trouve rien d'analogue dans les spores de l'*Ashbya Gossypii.* De plus, les spores de notre *Eremothecium* sont disposées dans le sporange sans ordre déterminé. Elles ont bien parfois une tendance à s'orien-

ter en faisceaux dont les pointes sont disposées dans le même sens, mais cela n'est nullement constant et les spores sont toujours entrecroisées, chevauchant les unes sur les autres et disposées le plus souvent sans ordre déterminé (fig. 7).

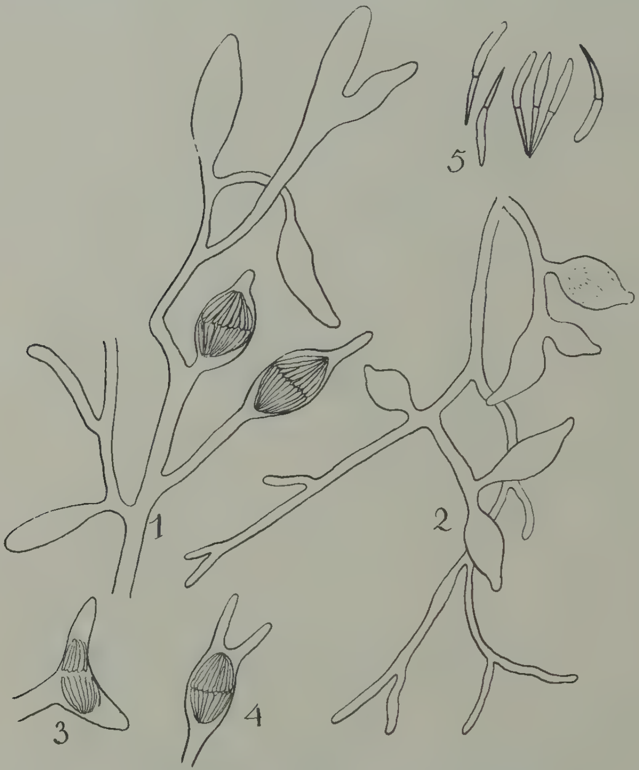


Fig. 24. — *Eremothecium Cymbalariae;* 1 à 4, mycélium avec formation des sporanges; 5, forme des spores (d'après G. Arnaud).

Notre Champignon se rapproche davantage encore de l'*Eremothecium Cymbalariæ* décrit par Borzi et retrouvé ensuite par Arnaud (fig. 24), puis par Ashby et Nowell, qui, lui aussi, offre un cycle de développement analogue à celui de l'*Ashbya Gossypii*. Comme l'*Eremothecium Cymbalariæ*, il offre un mycélium à cloisons transversales très rares, et ses spores sont tout à fait semblables, autant qu'on peut en juger par les descriptions des auteurs à celles de ce Champignon. Il diffère cependant de celles de l'*E. Cymbalariæ*, par le fait

que ses sporanges plus longs sont très nombreux et disposés en files dans les régions subterminales des filaments, comme dans le genre *Ashbya,* tandis que dans ce dernier, ceux-ci sont isolés et placés à l'extrémité des filaments. Il s'en distingue également par la disposition de ses spores qui, comme nous l'avons dit, s'enchevêtrent sans ordre, et ne sont pas disposées en faisceaux, ainsi que par le moins grand nombre de ses spores qui, d'après Arnaud, seraient d'environ 100 dans les sporanges d'*E. Cymbalariæ.*

Bien que nous n'ayons pu nous procurer une culture d'*Eremothecium Cymbalariæ,* il nous semble cependant, étant donné la forme caractéristique de ses spores, que notre Champignon doit être rattaché au genre *Eremothecium,* et nous proposons de le désigner sous le nom d'*Eremothecium Ashbyii,* dédié à l'éminent mycologue anglais Ashby.

Ce Champignon doit évidemment être rangé au voisinage du genre *Ashbya,* mais, comme ce dernier, il est extrêmement difficile de le situer dans la classification. Ces deux Champignons sont caractérisés par leurs sporanges qui, par le nombre de leurs spores oscillant entre 8 et 32, ainsi que par le mode de formation de celles-ci et la présence d'un épiplasme, présentent de très grandes analogies avec l'asque des Protoascinées. Ces sporanges diffèrent cependant essentiellement des asques par le fait qu'ils dérivent presque toujours non de cellules uninucléées, mais d'articles plurinucléés. Il semble donc difficile de les assimiler à des asques et de rapprocher les genres *Ashbya* et *Eremothecium* des Endomycétacées auxquels on devrait les rattacher si ces sporanges dérivaient de cellules uninucléées.

Toutefois, on ne peut exclure tout rapprochement entre le sporange de ces deux Champignons et l'asque, et, dans une étude antérieure, nous avions proposé une interprétation qui permettait de rattacher le genre *Ashbya* aux Ascomycètes. On sait que dans les Ascomycètes, les gamètes semblent résulter de la transformation de gamétanges. On trouve dans ces Champignons, à la fois la fusion de gamétanges, c'est-à-dire une gamétangie analogue à celle des Péronosporacées, et la fusion de gamètes. Dans une forme très primitive d'Ascomycètes, le *Dipodascus,* par exemple, la sexualité consiste en la fusion de deux gamétanges dont les gamètes sont réduits à l'état d'énergides, c'est-à-dire en la gamétangie, mais toutes les énergides de chaque gamétange dégénèrent sauf une, en sorte que la fusion nucléaire ne se

produit qu'entre l'un des noyaux mâles et femelles aboutissant à la formation d'un œuf simple qui germe immédiatement en se transformant en asque à nombreuses ascospores. Dans les Endomycétacées et les Levures, on ne trouve plus que des gamètes, et la sexualité consiste en la conjugaison de deux cellules primitivement uninucléées, c'est-à-dire de véritables gamètes.

On sait, en outre, que, dans de nombreuses formes de Protoascinées, la sexualité a disparu et que l'asque se forme aux dépens d'une cellule ordinaire, que l'on peut considérer comme un gamète se développant par parthénogénèse. C'est le cas de beaucoup de Levures, par exemple. Dans une forme très primitive, voisine du *Dipodascus*, l'*Ascoidea rubescens,* l'asque dérive d'un article multinucléé qu'on doit regarder comme un gamétange parthénogénétique. D'après Varitchak, les noyaux de ce gamétange dégénéreraient tous avant la formation de l'asque, sauf deux noyaux privilégiés qui se fusionneraient pour donner un noyau diploïde : c'est ce noyau qui en se divisant produirait les ascospores. On devrait donc considérer cette caryogamie comme un processus compensateur de la sexualité.

Partant de ces données, nous avions admis que le genre *Ashbya* représenterait une forme inférieure de Protascinées qui aurait conservé ses gamétanges comme les genres *Dipodascus* et *Ascoidea*, mais dans laquelle la sexualité ayant disparu, le gamétange se développerait directement en un asque. L'article plurinucléé aux dépens duquel se forme le sporange aurait donc la valeur d'un gamétange, et chacun de ses noyaux correspondrait à un gamète réduit à l'état d'énergide. Mais contrairement à ce qui se produit dans l'*Ascoidea,* d'après Varitschak, toutes les énergides persisteraient, et il n'y aurait aucun phénomène compensateur de la sexualité. Chaque énergide se développant parthénogénétiquement subirait 2 mitoses successives, donnant 4 noyaux-fils qui seraient le point de départ de 4 ascospores. Le sac sporifère du genre *Ashbya* aurait ainsi la valeur d'un asque composé et le nombre des ascopores serait déterminé par celui des énergides du gamétange au moment de sa transformation en sac sporifère.

Cette hypothèse peut s'appliquer au genre *Eremothecium ;* elle soulève cependant pour ce dernier quelques difficultés, puisque nous avons vu qu'on est obligé d'admettre que chacun des noyaux du jeune sporange subit un nombre variable de mitoses, tantôt une seule, tantôt

deux, tantôt trois. Pour qu'elle se confirme, il faudrait théoriquement que chaque noyau subisse deux mitoses successives. Cependant étant donné que cette hypothèse comporte l'obligation d'admettre que les énergides de chaque gamétange correspondent à des gamètes se développant par parthénogénèse, on ne peut s'étonner que les mitoses ne s'opèrent plus d'une manière régulière, la réduction chromatique devant être en même temps supprimée.

Mais une autre interprétation se présente à l'esprit. L'étude de l'*E. Ashbyii* conduit, en effet, à rapprocher ce Champignon de la forme gamétophytique du *Spermophthora Gossypii*. Ce Champignon offre, en effet, des sporanges qui rappellent beaucoup les gamétanges du *Spermophthora;* ceux-ci naissent de la même manière, sous forme de renflements au-dessous des extrémités des filaments et rappellent les asques par la mode de formation de leurs spores-gamètes et la présence d'un épiplasme. Les spores-gamètes du *Spermophthora* ont une forme très voisine de celles des spores de l'*Eremothecium*. Comme ces dernières, elles sont fusiformes avec, à l'une de leurs extrémités, une pointe plus aiguë ; mais cette dernière est beaucoup moins arquée que dans les spores d'*Eremothecium* et n'est pas vide de contenu ; cette pointe est pourvue d'une ligne saillante de la paroi suivant l'axe longitudinal du gamète jusque vers le milieu, ligne ici très nettement visible qui semble exister aussi, mais très peu accentuée, dans les spores d'*Eremothecium* (fig. 23). L'extrémité opposée se termine également en pointe, mais moins aiguë et n'est pas arrondie ou taillée en biseau, comme dans les spores d'*Eremothecium*. Enfin, la membrane de ces gamètes présente les mêmes réactions que celles des spores d'*Eremothecium* et paraît être de nature pectique : elle offre aussi des épaississements latéraux.

Rappelons que ce Champignon, isolé par Ashby et Nowell, de la stigmatomycose des graines de Cotonnier, présente un mycélium primaire (gamétophyte), dépourvu de toute cloison, qui donne naissance, dans les régions subterminales de ses rameaux, aux gamétanges renfermant de nombreux gamètes fusiformes dont nous venons de parler. Après gélification de la paroi du gamétange et, une fois mis en liberté, ceux-ci se conjuguent dans le milieu où ils se sont formés et donnent naissance à des zygospores qui germent immédiatement en donnant un court mycélium secondaire (sporophyte), constitué par des cellules généralement uninucléées dont les extrémités des rameaux forment de petits asques typiques à 8 ascospores : ces dernières germent en reproduisant le

mycélium primaire porteur de gamétanges. Ce Champignon offre donc le grand intérêt de constituer une forme intermédiaire entre les Siphomycètes et les Ascomycètes.

Depuis l'époque où nous l'avons étudié (1927-1928), le *Spermophthora Gossypii* a subi, à la suite de cultures prolongées au laboratoire, d'importantes modifications. Lorsque nous l'avons étudié, ce Champignon, cultivé sur un mélange de bouillon de carotte et de pomme de terre gélosé, formait de nombreux gamétanges, dont les gamètes une fois isolés se conjugaient immédiatement pour donner des zygospores qui germaient en donnant un mycélium secondaire avec des asques. Il formait également des gamétanges, mais en moins grand nombre, sur tranches de carotte et sur moût gélosé. Actuellement, il végète difficilement sur bouillon de carotte et de pomme de terre et ne produit plus qu'un mycélium stérile : celui-ci donne naissance à quelques renflements semblables aux gamétanges, mais qui n'aboutissent jamais à la production de gamètes et dégénèrent. Le Champignon ne fournit également sur moût de bière gélosé qu'un mycélium stérile. Parmi les milieux que nous avons essayés, nous n'avons pu obtenir de gamétanges arrivant à maturité, que sur tranche de carotte et surtout sur tranche de pomme de terre. Mais les gamètes une fois mis en liberté ne se conjuguent pas et ne germent jamais dans le milieu où ils se sont formés.

Placés sur gouttelettes pendantes en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier, sur bouillon de pomme de terre, sur gélose de Sabouraud glucosée ou sur moût de bière gélosé, ces gamètes germent en se gonflant et en donnant naissance à plusieurs tubes germinatifs qui croissent, sans se cloisonner, et se dichotomisent pour reproduire directement un mycélium primaire gamétophytique (fig. 25). Des cultures que nous avons fait venir du Bureau Central de Baarn ont montré les mêmes modifications.

Ainsi, le *Spermophthora Gossypii,* sans doute par suite de sa vie saprophytique, a perdu sa sexualité et ses gamètes germent directement sans conjugaison en se comportant comme de véritables spores et en reproduisant directement le mycélium primaire. La perte de la sexualité a donc été accompagnée de la suppression du sporophyte.

Pour expliquer cette modification survenue dans le cycle évolutif de ce Champignon, il n'y a que deux hypothèses possibles. L'une consiste à admettre que le *Spermophthora Gossypii* produirait deux sortes de sporanges de même forme : 1° des sporanges asexués donnant des spores

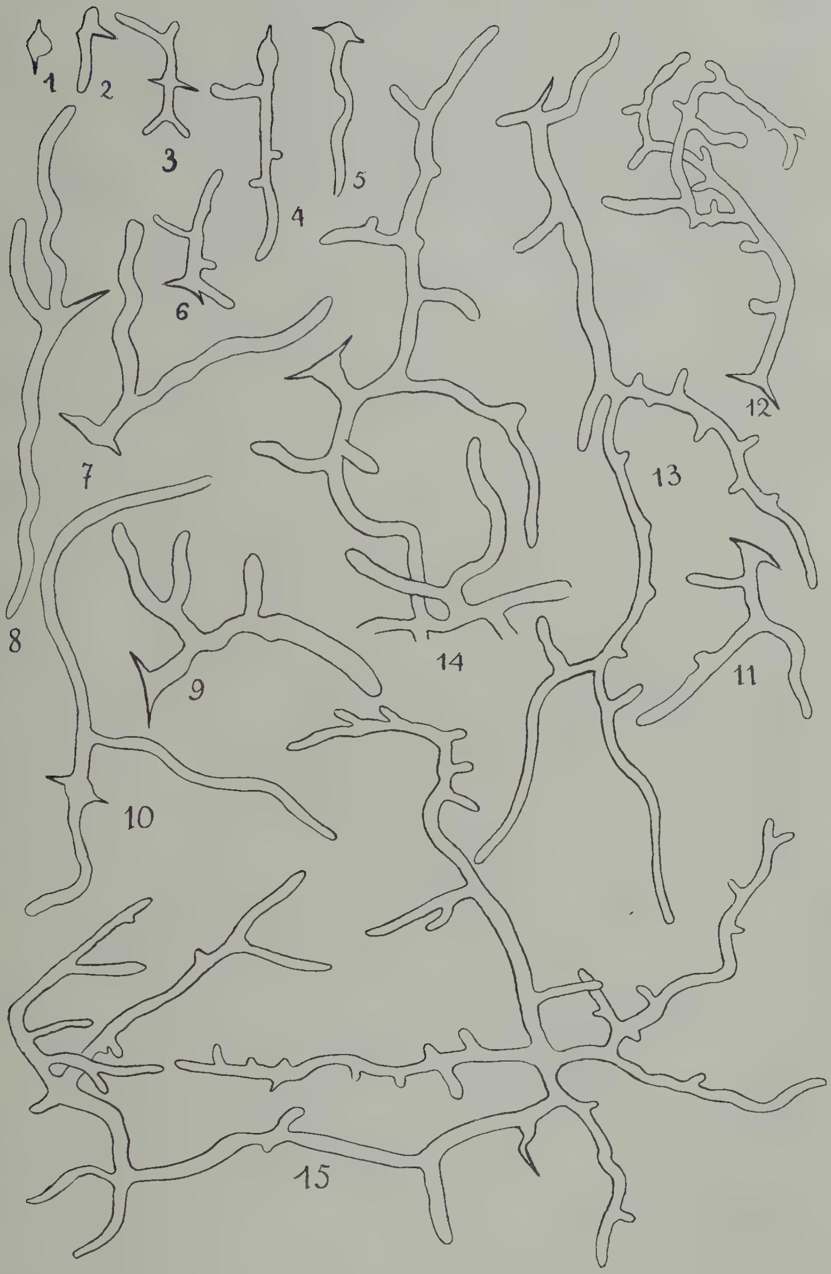


Fig. 25. — *Spermophthora Gossypii* (forme modifiée par la culture prolongée au laboratoire). Divers stades de la germination des spores observés sur gélose de Sabouraud, en chambre humide de Van Tieghem et Le Monnier. Les spores germent en produisant directement un mycélium primaire qui formera ensuite de nouveaux sporanges.

reproduisant le mycélium gamétophytique, 2° des gamétanges fournissant des gamètes de même forme que les spores, qui se conjuguent pour donner des zygospores, point de départ du mycélium sporophytique. Les gamétanges auraient disparu à la suite de cultures au Laboratoire, et seuls les sporanges auraient subsisté. Cette hypothèse pourrait s'appuyer sur le fait que Ashby et Nowell ont constaté que certaines spores sont capables de reproduire directement un mycélium primaire. Cependant, dans nos observations de 1927-28, nous avons observé de nombreux cas où les gamètes germaient par parthénogénèse, mais en produisant un mycélium sporophytique avec asques ; dans quelques cas, nous avons observé des gamètes qui ne donnaient naissance qu'à de courts filaments cloisonnés qui se terminaient par des sortes de conidies-levures, sans former d'asques, mais jamais nous n'avons vu, au cours de nos très nombreuses observations, de spores semblables aux gamètes qui soient susceptibles de donner naissance à un mycélium gamétophytique. Des sporanges asexués pouvaient néanmoins exister, et ne pas s'être produits dans les conditions où nous cultivions le Champignon.

La seconde hypothèse consisterait à supposer que le Champignon ne forme que des gamétanges, mais que les gamètes aient été amenés à germer directement par parthénogénèse en produisant non pas un mycélium sporophytique, mais un mycélium gamétophytique. Des phénomènes semblables ont été constatés chez les *Cutleria*. Sans vouloir prendre partie entre ces deux hypothèses, c'est à la seconde que nous serions tentés de donner la préférence.

Quoi qu'il en soit, que l'on adopte l'une ou l'autre de ces deux dernières opinions, ces faits nous suggèrent l'hypothèse que les genres *Eremothecium* et *Ashbya*, incontestablement très voisins, pourraient correspondre à des formes apparentées au *Spermophthora*, qui auraient subi la même transformation que nous avons constatée dans ce Champignon à la suite de cultures prolongées au laboratoire. Les genres *Eremothecium* et *Ashbya* seraient donc, soit des formes gamétophytiques de Champignons voisins du *Spermophthora*, dont les sporanges représenteraient soit des sporanges asexués de même forme que les gamétanges et seuls conservés, qui multiplieraient les thalles gamétophytiques, soit des gamétanges semblables à ceux du *Spermophthora* dont les spores-gamètes par suite d'une suppression de la sexualité germeraient en reproduisant directement le gamétophyte.

Telles sont les trois hypothèses que l'on peut formuler en ce qui con-

cerne les affinités des genres *Eremothecium* et *Ashbya*. La première permettrait d'établir une relation directe entre les genres *Ashbya* et *Eremothecium* et le genre *Nematospora* qui offre des asques, dont les ascospores ont la même forme que celle du genre *Ashbya*. Les Champignons de ce genre végètent sous forme de levures et de filaments mycéliens et forment des sacs sporifères dérivant de cellules uninucléées et présentant tous les caractères des asques. En l'état actuel de la Science, il est impossible de se prononcer entre ces trois hypothèses.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

ARNAUD (G.). — Note sur le genre *Eremothecium* Borzi (*Bull. Soc. Mycol. France*, T. XXIX, 1913).

ASHBY et NOWEL. — The Fungi of Stigmatomycosis (*Annals of Botany*, 1926).

BORZI. — *Eremothecium Cymbalariæ*, nuovo Ascomicete (*Bull. Soc. Bot. Italienne*, T. XX, 1888).

GUILLIERMOND (A.). — Recherches sur quelques Ascomycètes inférieurs isolés de la stigmatomycose des graines de Cotonnier. Essai sur la phylogénie des Ascomycètes (*Rev. Gén. Bot.*, T. 40, 1928).

— Sur un Champignon nouveau isolé des capsules du Cotonnier, l'*Eremothecium Ashbyii* et ses relations possibles avec le *Spermophthora Gossypii* (*C. R. As. Sc.*, T 200, 1935).

GUILLIERMOND (A.), FONTAINE et A. RAFFY — Sur l'existence dans l'*Eremothecium Ashbyii* d'un pigment jaune se rapportant au groupe des flavines. (*C. R. Ac. Sc.*, T. 200, 1935).

KUHN (R.). — Conférences sur les flavines (*Bull. Soc. de Chimie biologique*, T. XVII, 1935).

STELLING-DEKKER (Mme N. M.). — Die Hefesammlung des Centraalbureau voor Schimmelcultures (*Verhandelingen der Koninklijke Akademie van wetenschappen te Amsterdam*, T. XXVIII, 1931).

VARITCHAK (B.). — Contribution à l'étude du développement des Ascomycètes. Thèse de Doctorat ès Sciences (*Le Botaniste*, 1931).

LÉGENDES DES PLANCHES HORS TEXTE

PL. VII. — *Eremothecium Ashbyii* (fixation au picroformol de Bouin et coloration à l'hématoxyline ferrique).

Fig. 1 à 12 : Stades déjà avancés de la formation des sporanges. Les fig. 5 6, 7, 8, 9, 10 et 11 montrent les noyaux en voie de mitose (picroformol, hématoxyline ferrique).

Fig. 13 à 15 : Formation des spores (même méthode).

Fig. 18 : Jeune sporange (fixation au picroformol, coloration à l'hématoxyline de Delafield : les vacuoles sont remplies de corpuscules métachromatiques.

Fig. 19 : Jeune filament avec ses corpuscules métachromatiques (même méthode).

Fig. 16 : Spores vues à un fort grossissement (même méthode) ; on y voit le noyau et de petites vacuoles renfermant un corpuscule métachromatique.

Fig. 17 : Spore colorée par l'hématoxyline ferrique : on ne voit que les noyaux : les vacuoles apparaissent vides de contenu.

Fig. 20 et 21 : Sporanges achevés (picroformol-hématoxyline ferrique).

PL. VIII. — Localisation du pigment jaune dans l'*Eremothecium Ashbyii :*

Fig. 1 : Filament ayant cessé de croître et possédant de grosses vacuoles dont le suc est coloré en jaune ; dans le cytoplasme, on voit des globules graisseux surtout localisés autour des vacuoles.

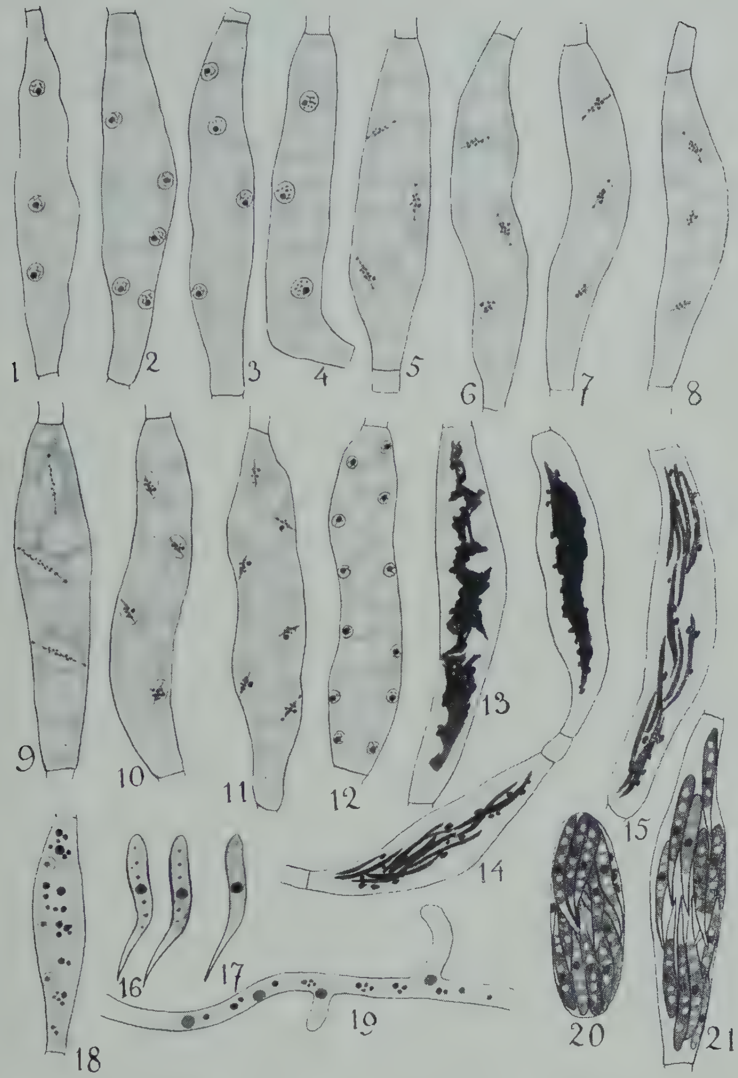
Fig. 2 et 3 : Articles séparés du mycélium (sporanges avortés) avec de grosses vacuoles teintes en jaune ; dans certaines, une partie du pigment a cristallisé sous forme de longues aiguilles.

Fig. 4 : Article séparé du mycélium (sporange avorté) dans lequel une partie du pigment jaune dissous dans les vacuoles a cristallisé sous forme de gros sphérocristaux.

Fig. 5 et 6 : Fragment de mycélium avec grosses vacuoles dont une partie du pigment jaune a cristallisé sous forme d'aiguilles groupées autour d'un centre ou en paquets.

Fig. 7, 8, 9 et 10. — Articles séparés du mycélium (sporanges avortés) montrant leur pigment dissous dans le suc vacuolaire : dans beaucoup de vacuoles se trouvent en même temps des cristaux aciculaires groupés en paquets et parfois même, fig. 7, 9 et 10, tout le pigment des vacuoles a cristalisé.

Fig. 11 : Fragment de filaments avec ses vacuoles renfermant le pigment jaune dissous et en partie cristallisé sous forme d'aiguilles.



A. GUILLIERMOND del.

Eremothecium Ashbyii Guilliermond

A. GUILLIERMOND del.

Eremothecium Ashbyii Guilliermond